

DOCKET NO.: 211341 US

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Virgilio B. LOUREIRO, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/PT00/00005

INTERNATIONAL FILING DATE: May 31, 2000

FOR: CULTURE MEDIUM FOR DETECTION OF DEKKERA AND BRETTANOMYCES

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTIONAssistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

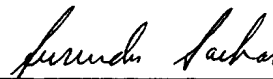
Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
Portugal	102306	31 May 1999

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/PT00/00005. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423



22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 1/97)

DOCKET NO.: 211341 US

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Virgilio B. LOUREIRO, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/PT00/00005

INTERNATIONAL FILING DATE: May 31, 2000

FOR: CULTURE MEDIUM FOR DETECTION OF DEKKERA AND BRETTANOMYCES

REQUEST FOR CONSIDERATION OF DOCUMENTS
CITED IN INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Assistant Commissioner for Patents

Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that applicant(s) request that the Examiner consider the documents cited in the International Search Report according to MPEP §609 and so indicate by a statement in the first Office Action that the information has been considered. When the Form PCT/DO/EO/903 indicates both the search report and copies of the documents are present in the national stage file, there is no requirement for the applicant(s) to submit them (1156 O.G. 91 November 23, 1993).

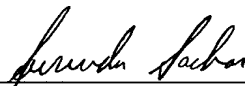
Respectfully submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 1/97)



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

REC'D 20 JUN 2000

WIPO

PCT

PT00/0005

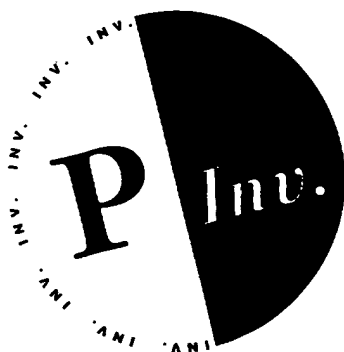
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

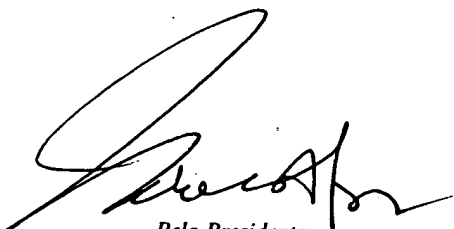
**CERTIFICADO DE PEDIDO
DE PATENTE DE INVENÇÃO**

Certifica-se que os documentos em anexo estão conforme o original do
pedido de patente de invenção nº. 102306.

O pedido foi apresentado no INPI no dia 31 de Maio de 1999.

Lisboa, 01 de Junho de 2000.




*Pelo Presidente
do Instituto Nacional da Propriedade Industrial*



**INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

FOLHA DO RESUMO

PAT. INV. <input checked="" type="checkbox"/>	MOD. UTI. <input type="checkbox"/>	MOD. IND. <input type="checkbox"/>	DES. IND. <input type="checkbox"/>	TOP. SEMIC. <input type="checkbox"/>	CLASSIFICAÇÃO INTERNACIONAL (51)
N.º Objectos <input type="checkbox"/> N.º Desenhos <input type="checkbox"/>					
N.º 102306 <input type="checkbox"/> (11)					DATA DO PEDIDO 31/05/99 (22)

REQUERENTE (71)
(NOME E MORADA)

INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA, português, com sede na Tapada da Ajuda, C.P. 1399 Lisboa, Portugal e STAB-TRATAMENTO DE ÁGUAS E BIOTECNOLOGIA, LDA., portuguesa, com sede na Qtª de Stª Teresa. 2825 Charneca da Caparica, Portugal, ☐ ☐ ☐

INVENTOR(ES) / AUTOR(ES) (72)

Nuno Miguel Sousa Falcão Freire Rodrigues, Maria da Graça Alves Gonçalves e Virgílio Borges Loureiro, Portugal

REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE(S) (30)

DATA DO PEDIDO

PAÍS DE ORIGEM

N.º DO PEDIDO

EPÍGRAFE (54)

"Meio de cultura para detecção e identificação de leveduras dos géneros Dekkera e Brettanomyces"

FIGURA (para interpretação do resumo)

RESUMO (max. 150 palavras) (57)

A invenção refere se a um meio de cultura para detectar leveduras dos géneros Dekkera e Brettanomyces. Contrariamente aos meios existentes, a presente invenção cria condições para as células viáveis dos géneros Dekkera e Brettanomyces originarem colónias, alterarem a cor do meio de cultura e produzirem compostos voláteis identificáveis pelo olfacto. Esse meio de cultura é constituído por 6,7 g/L "Yeast Nitrogen Base", 0,01g/L cicloheximida, 0,1g/L ácido p cumárico, 0,022g/L verde de bromocresol, 48g/L etanol e 20g/L agar, devendo o pH ser acertado a $5,40 \pm 0,05$ com um ácido forte. O ácido p cumárico é convertido, por leveduras destes géneros, em 4 etilfenol, que tem um aroma fenolado e permite, por isso, o seu reconhecimento. O aroma é perceptível ao fim de 5 a 10 dias e é característico dos géneros Dekkera e Brettanomyces. A mudança das colónias, de creme para verde, é também uma característica destes géneros. A invenção pode se aplicar quer a estirpes de leveduras previamente isoladas e purificadas quer a suspensões de populações mistas.

Descrição:

Meio de cultura para a detecção e identificação de leveduras dos géneros *Dekkera* e *Brettanomyces*


A presente invenção refere-se a um meio de cultura parcialmente selectivo e totalmente diferencial para a detecção de leveduras dos géneros *Dekkera* e *Brettanomyces* em cerca de 5 a 10 dias, que constitui uma alternativa às laboriosas técnicas clássicas de identificação. Normalmente, o estudo e caracterização da microflora de leveduras presentes nos mais diversos habitats (e.g. bebidas, alimentos, natureza) envolve uma primeira fase de isolamento das estirpes através de meios de cultura genéricos, para leveduras em geral, e uma segunda fase de identificação das estirpes isoladas através da utilização de métodos convencionais e/ou baseados na biologia molecular. O crescimento lento das leveduras dos géneros *Dekkera* e *Brettanomyces* torna extremamente difícil o seu isolamento em meios genéricos e, por conseguinte, a sua posterior identificação. Esta é feita através dos métodos clássicos que se baseiam numa série de características morfológicas e sexuais e incluem uma vasta gama de testes fisiológicos e bioquímicos. Trata-se de um trabalho muito exigente que não dá resultados em menos de uma a duas semanas e requer muita experiência para uma correcta interpretação dos resultados. Os métodos de identificação baseados na biologia molecular são mais rápidos que os clássicos mas também exigem experiência do operador, equipamentos e reagentes dispendiosos e as sondas ou iniciadores moleculares necessários à identificação.

O meio de cultura a que se refere a invenção obvia grande parte dos problemas verificados nos meios genéricos de uso corrente, nomeadamente a competição de espécies de leveduras de crescimento mais rápido, como as dos géneros *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Pichia* e das espécies *Schizosaccharomyces pombe* e *Torulaspora delbrueckii*. Porém, permite o crescimento de outras espécies de leveduras, como por exemplo *Saccharomyces unisporus*, *Zygosaccharomyces fermentati*, *Candida tropicalis*, *Lodderomyces elongisporus*, *Debaryomyces hansenii*, *Debaryomyces polymorphus*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica*, *Zygosaccharomyces florentinus* e *Zygosaccharomyces microellipsoides*, embora sem a produção do cheiro a 4-etil-fenol e, nalguns casos, sem a mudança de cor do indicador. O meio assegura resultados num prazo compreendido entre os 5 e 10 dias após a inoculação, e é constituído por "Yeast Nitrogen Base", cicloheximida, ácido p-cumárico, verde de bromocresol, etanol e agar.

Este meio não é autoclavável na totalidade, devendo a sua esterilização ser realizada do seguinte modo: cerca de 4/5 do volume total de água é esterilizado em autoclave, a 121°C durante 20 minutos, juntamente com o agar, tendo sido ajustado previamente o pH a $5,4 \pm 0,05$ com um ácido forte. No volume restante de água são dissolvidos os outros componentes do meio e acertado o pH a $5,4 \pm 0,05$ com um ácido forte. Esta solução é esterilizada por filtração. As duas soluções são misturadas só após o arrefecimento da solução de agar até cerca de 50°C.

De acordo com a invenção. As células são inoculadas neste meio e incubadas, preferencialmente, a 25°C. Ao fim de 5 a 10 dias, de acordo com o estado fisiológico das células, surgem as colónias e verifica-se a mudança de cor do meio de cultura de azul a amarelo. No caso das leveduras pertencerem aos géneros *Dekkera* e *Brettanomyces* será reconhecível o aroma fenolado do 4-etil-fenol, que é uma característica destes géneros. A mudança de cor das colónias de creme para verde é também uma característica destes géneros no meio em causa, observação que não se verifica para as restantes espécies.

A presente invenção pode ser aplicada directamente a suspensões mistas de leveduras, dando indicações sobre a presença destes géneros, sempre que se verifique o aroma fenolado no meio de cultura. Pode ainda ser aplicada a estirpes previamente isoladas e purificadas, não havendo, neste caso, necessidade do meio de cultura conter etanol e cicloheximida. A mudança de cor e a produção do cheiro fenolado surgirão, então, mais precocemente.



O processo de acordo com a presente invenção será ilustrado, seguidamente, através de exemplos:

Exemplo 1

O meio de cultura contendo 6,7 g/L de "Yeast Nitrogen Base", 0,01g/L de cicloheximida, 0,1g/L de ácido p-cumárico, 0,022g/L de verde de bromocresol, 48g/L de etanol e 20g/L de agar, devendo o pH do meio ser acertado a $5,40 \pm 0,05$ com um ácido forte. O meio é esterilizado do seguinte modo: cerca de 4/5 do volume total de água é esterilizado em autoclave, a 121°C durante 20 minutos, juntamente com o agar, tendo sido ajustado previamente o pH a $5,4 \pm 0,05$ com um ácido forte. No volume restante de água são dissolvidos os outros componentes do meio e acertado o pH a $5,4 \pm 0,05$ com um ácido forte. Esta solução é esterilizada por filtração. As duas soluções são misturadas só após o arrefecimento da solução de agar até cerca de 50°C . O meio homogeneizado é distribuído por placas de Petri. As estirpes de leveduras a identificar, previamente purificadas, são inoculadas neste meio, sob a forma de riscado ou de uma simples risca, e incubadas a 25°C . Todas as estirpes em que, no máximo após 10 dias de incubação, o meio muda de cor para amarelo e possui o cheiro fenolado, pertencem aos géneros *Dekkera* e *Brettanomyces*. A cor creme das colónias de leveduras destes géneros evolui para verde.

Exemplo 2

Como o anterior, mas aplicado a suspensões mistas de células de leveduras. Neste caso, para inocular, espalha-se uma alíquota da suspensão sobre o agar. Os resultados são similares aos descritos no exemplo 1, permitindo detectar a presença de leveduras dos géneros *Dekkera* e *Brettanomyces*.

Exemplo 3

Como o anterior, mas sem a adição de agar. Neste caso o meio é totalmente esterilizado por filtração e aplica-se a técnica do Número Mais Provável, utilizando-se em amostras onde seja previsível a presença de fungos filamentosos. Nesta situação verifica-se a mudança de cor azul do meio líquido a amarelo e a produção do aroma fenolado.

Exemplo 4

Como o exemplo 1, mas aplicado a suspensões mistas de bactérias e de leveduras. Os procedimentos e os resultados são idênticos aos do exemplo 1, mas o meio de cultura necessita de cloranfenicol e/ou oxitetraciclina para inibir o crescimento das bactérias.

Exemplo 5

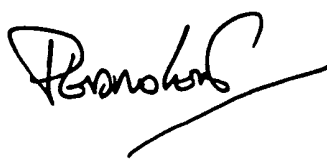
Como o exemplo 3, mas aplicado a suspensões mistas de bactérias e de leveduras. Os procedimentos e os resultados são idênticos aos do exemplo 3, mas o meio de cultura necessita de cloranfenicol e/ou oxitetraciclina para inibir o crescimento das bactérias.

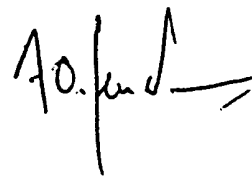
Exemplo 6

Como o exemplo 1, mas em que, ao invés de se inocular células de meio sólido se inoculam suspensões de células de uma estirpe. Os procedimentos para a inoculação é idêntico ao descrito no exemplo 2 e os resultados são idênticos aos descritos no exemplo 1.

Lisboa, 26 de Maio de 1999

Os requerentes





Reivindicações:

1ª

Meio de cultura selectivo e diferencial, caracterizado pelo formulário seguinte: 6,7 g/L de "Yeast Nitrogen Base", 0,01g/L de cicloheximida, 0,1g/L de ácido p-cumárico, 0,022g/L de verde de bromocresol, 48g/L de etanol e 20g/L de agar, devendo o pH do meio ser acertado a $5,40 \pm 0,05$ com um ácido forte.

2ª

Meio de cultura selectivo e diferencial de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo facto das leveduras dos géneros *Dekkera* e *Brettanomyces*, quando crescidas neste meio, mudarem a cor do meio de azul a amarelo e produzirem compostos voláteis de aroma fenolado e *sui-generis* ao fim de 5 a 10 dias, constituindo um método para o despiste expedito de leveduras destes géneros.

3ª

Meio de cultura selectivo e diferencial de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser um método para a identificação expedita de leveduras dos géneros *Dekkera* e *Brettanomyces*, pelo facto das leveduras destes géneros produzirem ácido acético, que muda a cor do meio de azul para amarelo, e 4-etil-fenol, que tem um aroma fenolado e *sui-generis*, facilmente reconhecível pelo olfacto.

4ª

Meio de cultura selectivo e diferencial de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por conter 0,1g/L de cloranfenicol e/ou 0,1g/L de oxitetraciclina, para detectar e identificar leveduras dos géneros *Dekkera* e *Brettanomyces* em bebidas, alimentos ou outros produtos contendo populações mistas de leveduras e bactérias.

5ª

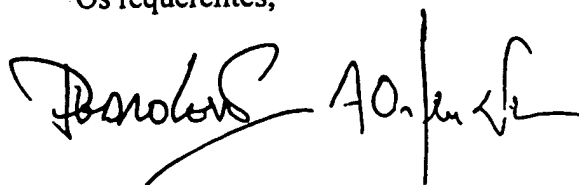
Meio de cultura selectivo e diferencial de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por conter todos os componentes à excepção do agar, para detectar e identificar leveduras dos géneros *Dekkera* e *Brettanomyces* em bebidas, alimentos ou outros produtos contendo populações mistas de leveduras, bactérias e fungos.

6ª

Meio de cultura de acordo com as reivindicações 1 e 4, caracterizado pelo facto de poder vir a integrar uma galeria de identificação, juntamente com outros testes para identificação de leveduras.

Lisboa, 26 de Maio de 1999

Os requerentes,

 10.10.99